

PATENT
0760-0299P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Yoshihiko KURANO et al. Conf.: 2911
Appl. No.: 10/005,120 Group: 1641
Filed: December 7, 2001 Examiner: UNKNOWN
For: ANTI-ABNORMAL TYPE PRION MONOCLONAL
ANTIBODY, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND
IMMUNOASSAY USING THE SAME

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

April 11, 2002

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	2000-374145	December 8, 2000

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By 
Gerald M. Murphy, Jr., #28,977

P.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000

GMM/las
0760-0299P

Attachment



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

Kurano et al.
10/005, 120
Filed 12/17/01
Birch Stewart Kolasch +
Birch, USA
(703) 205-8000
Docket # 0760-0299P
1 of 1

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年12月 8日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-374145

出 願 人

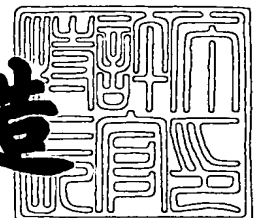
Applicant(s):

富士レビオ株式会社

2001年12月21日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3110366

【書類名】 特許願

【整理番号】 00661

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/577

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社内

【氏名】 倉野 義裕

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社内

【氏名】 梅谷 淳

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社内

【氏名】 宮腰 秀夫

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社内

【氏名】 柳谷 孝幸

【特許出願人】

【識別番号】 000237204

【氏名又は名称】 富士レビオ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088546

【弁理士】

【氏名又は名称】 谷川 英次郎

【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053235

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗異常型プリオンモノクローナル抗体及びその製造方法並びにそれを用いた異常型プリオンの免疫測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体。

【請求項 2】 免疫組織染色において異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは反応しない請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】 前処理していない異常型プリオンと反応する請求項 1 又は 2 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】 ハイブリドーマEBEB4C3Ebb(FERM P-18013)により産生されるモノクローナル抗体である請求項 3 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】 前記免疫原は、前記担体に配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むペプチドをさらに結合したものを免疫原として免疫した動物に由来する請求項 4 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】 ハイブリドーマEBEB4C3Ebb(FERM P-18013)により産生されるモノクローナル抗体である請求項 5 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】 請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 8】 請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体と異常型プリオンとの抗原抗体反応を利用した免疫測定により異常型プリオンを測定する方法。

【請求項 9】 請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を含む、請求項 8 記載の方法を行うための免疫測定用キット。

【請求項 10】 異常型プリオンの一次アミノ酸配列のうち不連続な複数の領域同士を連結して成る領域を含むペプチドを有する免疫原を動物に免疫し、免疫した動物の抗体産生細胞由来のハイブリドーマを作製し、異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、スクリーニングにより

選択されたハイブリドーマから前記抗異常型プリオンモノクローナル抗体を回収することを含む請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の抗異常型プリオンモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 1 1】 前記免疫原は、前記ペプチドを担体に結合したものである請求項 1 0 記載の方法。

【請求項 1 2】 前記免疫原は、複数種類の前記ペプチドを担体に結合したものである請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】 前記ペプチドは、E1領域、E2領域、B1領域、B2領域及びB3領域から成る群より選ばれる 2 以上の領域を連結して成る領域を含む請求項 1 0 ないし 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】 前記ペプチドは、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】 前記免疫原は、担体に、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するペプチドと、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有するペプチドとを結合したものである請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】 請求項 1 ないし 1 5 のいずれかの方法に用いられる免疫原

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗異常型プリオンモノクローナル抗体及びその製造方法並びにそれを用いた異常型プリオンの免疫測定方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術】

クロイツフェルト・ヤコブ病（以下、C J D と略）、ヒツジにおけるスクレーピー病、伝染性ミンク脳症をはじめとする脳神経系疾患は、長期間の潜伏期間を経た後に発症し、ほぼ神経系に限局した脳組織の海綿状変性およびアミロイド斑（クールー斑）を主徴とする疾患であり、進行性に増悪して死に至る。発症原因は未だ不明な点も多いものの、ウイルスなどの感染性病原体の関与ではなく、異

常型プリオン蛋白質の沈着に起因するとの考え、いわゆる「プリオン仮説」が主流である。この疾患は脳薄切標本の病理学的手法により診断されている。

【0003】

この疾患の起因源は感染性を有するとされ、脳神経組織の摂食（クールー病など）、電極あるいは脳硬膜移植などの医療行為による感染も報告されている。最近では、ウシ海綿状脳症ならびに新型CJDが経口感染により伝播すると考えられている。

【0004】

正常型プリオン蛋白質は細胞膜に存在する糖蛋白質であり、真核細胞である酵母をはじめとして広く存在している。また、正常型プリオン蛋白質をコードする遺伝子は単一遺伝子であり、コードされるアミノ酸配列は哺乳類の間では非常によく保存されており、特にヒト、ヒツジ、ウシの間の相同性は約90%以上と報告されている。

【0005】

正常型プリオン蛋白質の機能については未だ不明といわざるを得ないが、アミノ酸配列が保存されていることから神経組織の発生分化および機能に重要な役割を担っているであろうと推測される。また、最近のプリオン蛋白質遺伝子ノックアウトマウスでの検討からは、加齢に伴う下半身の振戦などの歩行異常、病理学的には小脳の萎縮、特に小脳プルキンエ細胞の脱落などが観察されている。

【0006】

ヒトにおいてはプリオン蛋白質のアミノ酸配列（一次構造）の一部で個人ごとの違いはあると報告されているものの、CJDを発症する患者と健常者の間ではプリオン蛋白質のアミノ酸配列に差異は認められない。このため、異常型プリオン蛋白質の沈着は、アミノ酸配列ではなく立体構造の異なることに起因すると考えられている。このため、従来の手技により作製された抗体のうち、アミノ酸の一次配列を認識する抗体では両者を区別することはできない。また、アミノ酸配列が動物間で非常によく保存されているために抗原性の弱いことも推測される。このため、立体構造を維持したままの免疫原であるとともに、抗原性を高めた抗原の作製が望まれる。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、正常型プリオンと異常型プリオンとを識別することを可能とするモノクローナル抗体及びその製造方法を提供することである。また、本発明の目的は、該モノクローナル抗体を用いて異常型プリオンを免疫測定する方法を提供することである。

【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】

正常型プリオンと異常型プリオンとを識別することを可能とするモノクローナル抗体を作製しようとするのであれば、異常型プリオンを免疫原として用いて動物を免疫し、常法によりモノクローナル抗体を得、異常型プリオンと反応するが正常型プリオンとは反応しないモノクローナル抗体をスクリーニングすることが考えられる。しかしながら、プリオンタンパクは異常型と正常型でアミノ酸配列に差がないばかりではなく、種特異性も少ないので一般的に抗体ができづらいタンパク質であり、その上異常型と正常型の差を認識するような抗体は更にできづらい。また、異常型プリオンを免疫原として用いるのに十分な量を確保することが困難なタンパク質である。異常型プリオンを有する疾患の頻度が低い上に、病原体として強力なので取り扱いにも細心の注意が必要であり、取り扱える施設にも限りがある。そのようなものを大量に確保することはかなり困難である。更に、免疫原とするためにはある程度精製する必要があるが、精製する段階でこのタンパク質は不溶化してしまい免疫原には適さなくなる。免疫原として用いるためには変性剤等を用いて可溶化するが、このときに異常型に固有な立体構造が保持されているか問題になる。これらの理由により、異常型プリオンを免疫原として用いることにより、正常型プリオンと異常型プリオンとを識別することを可能とするモノクローナル抗体を作製することは困難である。

【 0 0 0 9 】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、異常型プリオンの立体構造において、外部に露出していると考えられる領域を推定し、これらの領域のうちの複数のものを連結したペプチドを含む免疫原を用いることにより、正常型プリオンと異常型プ

リオンとを識別することを可能とするモノクローナル抗体を作製することに成功し、本発明を完成した。

【0010】

本発明は、異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体を提供する。また、本発明は、上記本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供する。さらに、本発明は、上記本発明のモノクローナル抗体と異常型プリオンとの抗原抗体反応を利用した免疫測定により異常型プリオンを測定する方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のモノクローナル抗体を含む、上記本発明の免疫測定方法を行うための免疫測定用キットを提供する。さらに、本発明は、異常型プリオンの一次アミノ酸配列のうち不連続な複数の領域同士を連結して成る領域を含むペプチドを有する免疫原を動物に免疫し、免疫した動物の抗体産生細胞由来のハイブリドーマを作製し、異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、スクリーニングにより選択されたハイブリドーマから前記抗異常型プリオンモノクローナル抗体を回収することを含む、上記本発明の抗異常型プリオンモノクローナル抗体の製造方法を提供する。さらに、本発明は、該製造方法に用いられる免疫原を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明のモノクローナル抗体は、異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体である。ここで、「実質的に反応しない」とは、正常型プリオンに対する反応性が、異常型プリオンに対する反応性よりも識別可能な程度に低いことを意味する。従って、正常型プリオンに対して交差反応性を有する場合であっても、その親和性が、異常型プリオンに対する親和性よりも識別可能な程度に低い場合には、本明細書で言う「正常型プリオンとは実質的に反応しない」場合に含まれ、本発明の範囲に含まれる。

【0012】

本発明のモノクローナル抗体は、免疫組織染色において異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは反応しないものが好ましい。また、プリオンの免疫組織染色は、従来、いわゆる「酸オートクレーブ処理」（1.0～100 mM HCl溶液に浸漬した組織を121℃、20分間でオートクレーブ処理する）を行った後に行っていたが、本発明のモノクローナル抗体は、この酸オートクレーブ処理のような前処理を行わない組織に存在する異常型プリオンと反応するものであることが好ましい。このような抗異常型プリオンモノクローナル抗体の具体例として、下記実施例において作製した、ハイブリドーマEBEB4C3Ebbにより産生されるモノクローナル抗体を挙げることができる。なお、ハイブリドーマEBEB4C3Ebbは生命工学工業技術研究所にFERM P-18013の受託番号で寄託されている。

【0013】

上記の通り、異常型プリオンを免疫原として用いて、異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体を作製することは困難である。この問題を解決するために、本願発明者らは、先ず、異常型プリオンの立体構造を独自に推測した。図1に、正常型プリオンの立体構造(PrP^{C} モデル)、Korthらにより推測された異常型プリオンの立体構造(PrP^{Sc} モデル1)C. Korth et al., Nature 390:74-77, 1997)、及び本願発明者らが推測した異常型プリオンの立体構造(PrP^{Sc} モデル2)を図1に示す。本願発明者らが推測した異常型プリオンの立体構造は、これまでにKorthらによって推測されていた立体構造よりも β シート構造が多くなっている。この推測の根拠は、CDスペクトルとFT-IRの結果から、 $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ の過程で α ヘリックスは40%から30%へ減少し、 β 構造はごくわずかから45%まで増大するといわれている。NMRによる立体構造(123-231)から計算すると、非常にフレキシブルで構造を決定できないN-末端の繰り返し配列部分をのぞいて、 PrP^{C} の二次構造は α ヘリックス25%、 β 構造3.4%になる(全長231残基として)。計算できないN-末端部分の α ヘリックス含量に対する寄与が15%程度あるとして、Korthらのモデルで PrP^{Sc} の計算をすると、 α ヘリックス36%、 β 構造7%になる。したがって、Korthらのモデルでは、CDスペクトルとFT-IRの結果を一部しか説明できない。そこで、さらに α ヘリックスが減少し β 構造が増加するような構造変化に

ついて考えてみた。前回もB2、B3の位置を決めるのに利用したSSTによる二次構造予測で二次構造の含量を計算すると、 α ヘリックス5.6%、 β 構造18%となった。二次構造予測の精度は別として、Prionタンパクはもともと α ヘリックスよりも β 構造をとりやすいタンパクであるといえる。さらに詳しく見て行くと、PrPCの α ヘリックス2に当たる部分はほぼ半分が β 構造の判定で、その他はC(random coil)構造であり、 α ヘリックス3でも後半に α ヘリックス判定の残基があるほかは β 構造またはC構造である。そこで、 α ヘリックス2の前半と α ヘリックス3の後半が β 構造に変化したモデルを作ってみた(モデル2)。

【0014】

このモデルではKorthらのモデルと違い、15B3のepitopeを形成するE1、E2、E3の部分すべてが構造変化を起こしていることになるが、分子模型では3つの部分がすべて β ヘアピン構造となって集まるようにすることができるので矛盾は起こらない。またこのモデルの二次構造含量は、 α ヘリックス27%、 β 構造17%になり、CDスペクトルとFT-IRの結果と完全に一致するものではないがKorthらのモデルよりも近い値を示した。

【0015】

本願発明者らは、この独自に推測した異常型プリオンの立体構造において、外部に向かって露出している領域、すなわち、B1領域(プリオンの一次アミノ酸配列の第128番目のアミノ酸から第131番目のアミノ酸、以下「128-131a.a.」のように記載)、B2領域(138-141a.a.)及びB3領域(149-152a.a.)並びにE1領域(141-149a.a.)及びE2領域(164-170a.a.)及びE3領域のうちの2以上の領域を連結したペプチドを免疫原として用いることにより異常型プリオンに特異的に反応するモノクローナル抗体が得られるのではないかと考え、実験の結果、下記実施例に具体的に記載するように、E1領域とB1領域の連結ペプチド(配列番号1)と、E2領域のペプチド(配列番号2)とをそれぞれ同一のKLHに結合したものを免疫原として用いて、上記ハイブリドーマEBEB4C3Ebbにより産生されるモノクローナル抗体を得た。なお、上記各領域は、直接連結してもよいし、1個ないし数個の他のアミノ酸を介在させて間接的に連結してもよい。また、上記各領域は、1個ないし数個のアミノ酸が欠失又は付加されていてもよい。このように、タンパ

ク質の一次アミノ酸配列における不連続な領域を連結したものを免疫原として用いるという思想は、本願発明者らの独創によるものである。なお、上記各領域のアミノ酸配列は次の通りである。

B1: Tyr Met Leu Gly

B2: Ile Ile His Phe

B3: Tyr Tyr Arg Glu

E1: Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg

E2: Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser

【 0 0 1 6 】

上記ペプチドは、そのまま免疫原として用いることも可能ではあるが、キーホールリンペットヘモシアニン（K L H）や、ウシ血清アルブミン（B S A）のような担体分子に上記ペプチドを結合したものを免疫原として用いると抗原性が高まるので好ましい。また、1つの担体分子に複数種類の上記ペプチドを結合したものを免疫原として用いることも好ましい。

【 0 0 1 7 】

上記した免疫原を用いること以外は、常法により本発明のモノクローナル抗体を作製することができる。すなわち、上記免疫原を動物に免疫し、免疫した動物の抗体産生細胞由来のハイブリドーマを作製し、異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、スクリーニングにより選択されたハイブリドーマから前記抗異常型プリオンモノクローナル抗体を回収することにより行うことができる。脾細胞やリンパ球のような抗体産生細胞と、ミエローマ細胞のような不死化細胞とのハイブリドーマを作製する方法はこの分野において周知である。

【 0 0 1 8 】

本発明のモノクローナル抗体と異常型プリオンとの抗原抗体反応を利用した免疫測定により異常型プリオンを測定することができる。なお、ここで、「測定」には検出及び定量測定の両者が包含される。免疫測定方法自体はこの分野において周知であり、周知のいずれの方法も本発明の範囲に含まれる。すなわち、反応

形式に基づき分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法等があり、標識に基づき分類すると、酵素免疫分析、放射免疫分析、蛍光免疫分析等があるがこれらのいずれもが本発明で言う「免疫測定」に包含される。さらに、免疫組織染色や、ウェスタンブロット等も本発明で言う「免疫測定」に包含される。また、各免疫測定に必要な試薬類も周知であり、モノクローナル抗体に特徴があること以外は、通常の免疫測定キットを用いて免疫測定を行うことができる。

【0019】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0020】

(1) 免疫原の作製

Korthらは、ウシプリオン蛋白質を遺伝子組換え手法で発現させたりコンビナント抗原を免疫原として抗体認識部位（エピトープ）を解析し、プリオン蛋白質の主要抗原部位は上記E1領域、E2領域及びE3領域の3ヶ所と報告している（Korth et al., 上掲）。この結果を基に、正常型プリオン蛋白質の立体構造を推測すると、E2とE3は近接するもののE1とは距離があると考えられる。これに対し、上記のように β シート構造を取った場合を推測すると、E1がループ構造をとることにより新たに出現する二本の β 鎖（B2, B3）を形成するとともに、新たなエピトープを形成すると思われる。このため、E1領域とB1領域を連結したE1B1ペプチド（配列番号1）と、E2領域から成るE2-1ペプチド（配列番号2）とを常法により化学合成し、これらを常法によりKLHに結合した結合体を免疫原として用いた。

【0021】

(2) 免疫および細胞融合

濃度0.5 1.0 mg/mLの免疫原を等量のプロイント完全アジュバントに懸濁し、BALB/Cマウスに0.2 0.3 mL/mouseずつ、2ないし3回免疫した。最終免疫後3ないし4日後に脾臓を摘出し、細胞を分散させた後に、ポリエチレングリコール法によりP3U1 ミエローマ細胞との細胞融合を行った。

【 0 0 2 2 】

HAT培地中での培養によりハイブリドーマを選択した後、抗体産生細胞のスクリーニングは、上記各合成ペプチドをウシ血清アルブミン (BSA: bovine serum albumin) に結合させた抗原を使用してELISA法で行った。すなわち、細胞培養上清を採取し、BSA結合体を固定した ELISAプレート (96 well-type) に分注して反応させた後に洗浄、さらに西洋わさびペルオキシダーゼ酵素 (HRP) 標識抗マウスIg (IgG+IgM) を反応させ、発色反応で抗体産生細胞の有無を確認した。表 1 にELISAによる陽性数を示す。

【 0 0 2 3 】

【表 1】

表 1

融合効率	100%
IgG 産生率	100%
1 次スクリーニング陽性	114 ウェル
2 次スクリーニング陽性	54 ウェル

【 0 0 2 4 】

(3) 異常型プリオン特異反応性モノクローナル抗体のスクリーニング

抗体の特異性を確認する目的で、GSS (Gerstmann Straussler症候群) 患者脳より脳薄切切片を作製し、免疫組織学的検索で反応性を検討した。標本は前処理として酸オートクレーブ処理を行ったもので行わなかったものを用い、異常型プリオン蛋白質に特異的に反応する抗体クローンを選別した。また、対照としては、正常ヒト脳薄切切片を酸オートクレーブ処理したものおよびしなかったものを用い、反応の認められないことを確認した。この免疫組織染色の操作を具体的かつ詳細に述べると次の通りである。

【 0 0 2 5 】

1. 組織片をキシレンにて脱パラフィン化した後、アルコール濃度を段階的に下げ水和した。
2. 蒸留水にて 5 分間洗浄した。

3. 0.3%過酸化水素・メタノール溶液に浸し30分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。
4. 生理的磷酸緩衝液で5分間洗浄した。
5. 酸オートクレーブ処理するものは10～1000mM塩酸液に浸漬し、121℃,20分間オートクレーブ処理を行った。
6. 生理的磷酸緩衝液にて5%に希釈した家兎血清を室温で30分間反応させた。
7. 余分な血清を取り除きハイブリドーマ培養液を室温で1時間反応させた。
8. 生理的磷酸緩衝液で5分間洗浄した。
9. 適正濃度に希釈したビオチン化抗マウスイムノグロブリン家兎を室温で1時間反応させた。
10. 生理的磷酸緩衝液で5分間洗浄した。
11. 所定濃度に調製したABC試薬（Vector社製）を室温で30分間反応させた。
12. 生理的磷酸緩衝液で5分間洗浄した。
13. ペルオキシダーゼ基質溶液を室温で5～30分反応させた。
14. 蒸留水で洗浄した。
15. リリーマイヤー・ヘマトキシリンにて対比染色を行った後、洗浄・封入を行った。

上記操作にて選択された細胞株を表2に示した。

【0026】

【表 2】

	GSS		正常組織					
			小脳		大脳		視床	
オートクレーブ	+	-	+	-	+	-	+	-
EB22D1-2	+	-	-	-	-	-	-	-
EB12D21	+ ^w	-	-	-	-	-	-	-
EBEB4C3Ebb	+	+	-	-	-	-	-	-
EB12A32	+ ^w	+ ^w	-	-	-	-	-	-
EB22B61	+	+	-	-	-	-	-	-

(表中、オートクレーブの行中の+はオートクレーブ処理有り、-はオートクレーブ処理なし、各モノクローナル抗体の行中の+は陽性、-は陰性、+^wは弱陽性を示す)

【 0 0 2 7 】

(4) 結果

以上の結果、異常型プリオンとは反応するが、正常型プリオンとは実質的に反応せず、これらの識別を可能とするモノクローナル抗体が得られた。このモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマEBEB4C3Ebbは、生命工学工業技術研究所に寄託し、その受託番号はFERM P-18013である。

【 0 0 2 8 】

【発明の効果】

本発明により、異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体が初めて提供され、本発明により、異常型プリオンの免疫測定が初めて可能になった。従って、本発明は、C J D の診断に大いに貢献するものと考えられる。

【 0 0 2 9 】

【配列表】

<110> FUJIREBIO INC.

<120> Anti-abnormal prion monoclonal antibody, process for producing the same and immunoassay using the same

<130> 00661

<160> 2

【 0 0 3 0 】

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide used as immunogen for raising anti-abnormal prion monoclonal antibody

<400> 1

Ile Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu

1

5

10

15

【 0 0 3 1 】

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide used as immunogen for raising anti-abnormal prion monoclonal antibody

<400> 2

Val Tyr Try Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser Asn Cys

1

5

10

【0032】

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapience
<400> 3

Tyr Met Leu Gly

1

【0033】

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapience
<400> 4

Ile Ile His Phe

1

【0034】

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapience
<400> 5

Tyr Tyr Arg Glu

1

【0035】

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapience

<400> 6

Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg

1

5

【 0 0 3 6 】

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapience

<400> 7

Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser

1

5

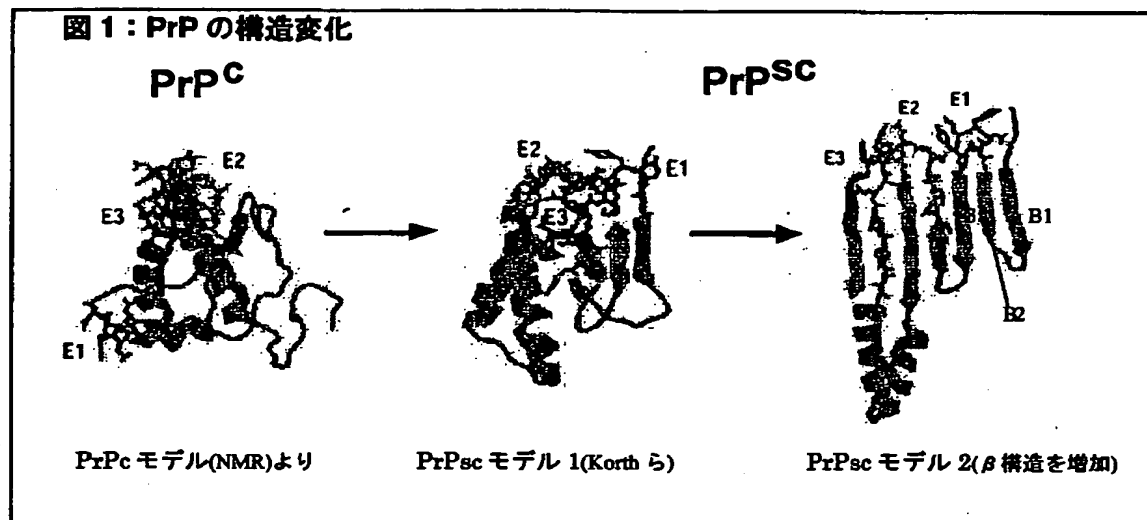
【 図 面 の 簡 単 な 説 明 】

【 図 1 】

正常型プリオンの立体構造、Korthらの報告に記載された異常型プリオンの立体構造及び本願発明者らが推測した異常型プリオンの立体構造を模式的に示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 正常型プリオンと異常型プリオンとを識別することを可能とするモノクローナル抗体及びその製造方法を提供すること。

【解決手段】 異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体を提供した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-374145
受付番号	50001585699
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成12年12月11日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年12月 8日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000237204]

1. 変更年月日	1997年 5月12日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号
氏 名	富士レビオ株式会社